

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：82643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09644

研究課題名（和文）ロングリードシーケンサーを用いた難聴遺伝子CNVの同定と簡易検査法の確立

研究課題名（英文）Identification of CNV of deafness gene and development of simple test method by long read sequencing

研究代表者

松永 達雄（Matsunaga, Tatsuo）

独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・聴覚・平衡覚研究部・部長

研究者番号：90245580

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ショートリードシーケンサー結果を元にした遺伝子コピー数変異（CNV）予測手法（2種の予測プログラム）を、これまで研究室で収集してきた難聴検体に対し実行した。CNV変化の確認にはMLPA法またはTaqManプローブを用いた定量的PCRによるアッセイを用い、複数難聴遺伝子のCNV全5種類を検出し、今まで原因不明だった難聴検体の原因判定につなげることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性難聴の原因の一部に、ゲノム領域の大きな欠失・重複であるCopy Number Variant (CNV) が関与している。しかし、CNVは現行の各種検査・解析手法では検出が困難であった。本研究では、新たな遺伝子解析技術であるロングリードシーケンサーによるCNV同定、簡便なCNV検出法の構築を可能にした。本研究によって構築されるCNV検出法は、難聴の遺伝子診断率の向上と、より効果的な医学的介入につながるものである。

研究成果の概要（英文）：Two prediction programs for copy number variation (CNV) based on short-read sequencing results were run on hearing loss samples collected in the laboratory, using either the MLPA method or quantitative PCR assays with TaqMan probes to confirm CNV changes. Five types of CNVs were detected, leading to the determination of the cause of hearing loss in specimens with previously unidentified hearing loss.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：難聴 遺伝子解析 コピー数変異

I 研究開始当初の背景

遺伝性難聴の原因の一部に、ゲノム領域の大きな欠失・重複である **Copy Number Variant (CNV)** が関与している。特に軽～中等度の小児難聴の約 **30%**の原因である **STRC** 遺伝子では、**90%**以上の症例で **CNV** が難聴の原因である。しかし、**CNV** は現行の **single nucleotide variant (SNV)** 検出を主目的として構築された各種検査・解析手法とは異なる検出方法が必要となる。

網羅的難聴遺伝子解析に用いられる **Illumina** 社製ショートリードシーケンサーは通常 **exon** 領域を解析対象にしているため、**CNV** 領域内の **exon** の **read depth** が他領域に対して増減することで理論的には **CNV** の検出は可能であり、複数の **CNV** 予測プログラムも発表されている。しかし実際には、検体間の解析結果のばらつきを起因として、それらプログラムの予測精度に問題があることも知られていた。

もう一つの手法としては、新たな遺伝子解析技術であるロングリードシーケンサーによる **CNV** 同定法が挙げられた。本法は費用やシーケンス配列信頼性の低さといった問題がある一方で、ゲノム配列を長鎖にわたり取得することから **CNV** の両端を厳密に決定できる可能性が高いと考えられた。

II 研究の目的

本研究では、簡便かつ精度が高い **CNV** 検出法を検出すること、および **CNV** と従来の **SNV**・ショート **indel** バリエントを含めた綿密な **genotype-phenotype** 関連解析に基づくバリエントの病的意義の解釈を目的とする。

III 研究の方法

Illumina 社製ショートリードシーケンサー結果を元にした遺伝子コピー数変異 (**CNV**) 予測手法としては、2種の予測プログラム **panelcn.MOPS** (<https://github.com/bioinf-jku/panelcn.mops>) および **DECoN** (<https://github.com/RahmanTeam/>)によるコピー数の増減予測を統合したものを利用した。さらに、この **CNV** 予測手法を改良し **Graphical User Interface** に対応させ、解析実施者に対する負担を軽減させた。また、**CNV** が実際に検出された検体とされなかった検体の2群に分け、各検体のリード率、ベイズファクター、エクソン数のデータにフィッシャーの線形判別式を適用することにより判定精度を上げた。結果の検証には **TaqMan-PCR** および **MLPA** 法を用いた。家族検体を用いた遺伝形式の検証も実施した。各種公的データベース (**gnomAD**, **DGV**, **dbVar**, **DECIPHER**, **ClinVar** など) に登録されている病的バリエントとの比較および一般集団における頻度も検討した。

ロングリードシーケンサーによる **CNV** 同定には **Nanopore** 社 **MK1C** を用いた。ゲノム配列取得後、参照配列 **GRCh38** へのマッピングプログラム 3種類 (**Minimap2**, **NGMLR**, **HS-BlastN**)、構造変異候補検出プログラム 3種類 (**SVIM**, **Sniffles**, **Nanovar**)

の組み合わせにより候補 **CNV** の検出を試みた。解析対象には、難聴遺伝子に大欠失がすでに同定されている (**CNV** 両端は未同定) 難聴検体を用いた。

IV 研究の成果

Illumina 社製ショートリードシーケンサー結果を元にした遺伝子コピー数変異 (**CNV**) 予測手法を、これまで研究室で収集してきた **339** 例の難聴検体および新規の原因不明難聴者 **335** 検体に対し実行した。**CNV** 変化の確認には **MLPA** 法または **TaqMan** プローブを用いた定量的 **PCR** によるアッセイをもちい、**STRC, PCDH15, SOX10, SLC26A4 MYO15A** など複数難聴遺伝子の **CNV** 全 **5** 種類を計 **5** 検体で検出し、さらに家系解析を実施し、今まで原因不明だった難聴検体の原因判定につなげることに成功した。

Nanopore 社製ロングリードシーケンサーを用いた **CNV** 解析については、**CNV** 検出自体は、どのプログラムの組み合わせを用いた場合でも成功した。しかしシーケンス配列の信頼性の低さを主たる原因として、現在までに遺伝子大欠失の末端位置同定には至っていない。今後はシーケンス配列信頼性が大幅に改善された新バージョンのフローセル、改良された解析プログラムを検討し、難聴遺伝子の **CNV** 末端位置の決定、リピート領域でのリピート数多様性および変異の検出法の開発を目指していきたいと考えている。

以上、研究期間全体を通じて、ショートリードシーケンサー結果を利用した **CNV** 予測プログラムの構築に成功した。実際の難聴検体を用いた有効性の検討が進み、遺伝性難聴における **genotype- phenotype** 関連解析の知見が蓄積された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 松永達雄	4. 巻 94
2. 論文標題 遺伝学的検査の基本と最新情報	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	6. 最初と最後の頁 1010-1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masuda M, Kanno A, Nara K, Mutai H, Morisada N, Iijima K, Morimoto N, Nakano A, Sugiuchi T, Okamoto Y, Masuda S, Katsunuma S, Ogawa K, Matsunaga T	4. 巻 12
2. 論文標題 Phenotype-genotype correlation in patients with typical and atypical branchio-oto-renal syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-04885-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hideki Mutai, Yukihide Momozawa, Yoichiro Kamatani, Atsuko Nakano, Hirokazu Sakamoto, Tetsuya Takiguchi, Kiyomitsu Nara, Michiaki Kubo, Tatsuo Matsunaga	4. 巻 17
2. 論文標題 Whole exome analysis of patients in Japan with hearing loss reveals high heterogeneity among responsible and novel candidate genes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-022-02262-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 小野智愛、坂本浩一、馬場遥香、松永達雄	4. 巻 44
2. 論文標題 Copy Number Variation (CNV) による感音難聴の3症例への遺伝カウンセリング	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 小児耳鼻咽喉科	6. 最初と最後の頁 355-360
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 井上沙聡、奈良清光、務台英樹、南修司郎、加我君孝、和佐野浩一郎、松永達雄
2. 発表標題 当院を受診した難聴者に対する遺伝子診断と遺伝カウンセリングの現況
3. 学会等名 第 31 回日本耳科学会 総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松永達雄
2. 発表標題 難聴患者に対するゲノム情報を活用した個別最適医療
3. 学会等名 第17回感覚器シンポジウム 感覚器を取り巻くゲノム医療の最前線（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Matsunaga T
2. 発表標題 Innovation of clinical practice for hearing loss by implementation of large-scale genetic test
3. 学会等名 Luncheon Seminar, The 14th International Collaborative Forum of Human Gene Therapy for Genetic Disease (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Matsunaga T
2. 発表標題 Genetic Basis of Hearing Loss
3. 学会等名 Symposium: Recent Advances in the Diagnosis and Management of Genetic Hearing Loss, The 19th Korean-Japan Joint Meeting of Otorhinolaryngology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Mutai H, Miya F, Nara K, Muramatsu R, Inoue S, Murakami H, Minami S, Nakano A, Arimoto Y, Morimoto N, Kawasaki T, Wasano K, Sakamoto H, Katsunuma S, Masuda S, Yamazawa K, Kosaki K, Tsunoda T, Matsunaga T
2. 発表標題 Efficient identification of causative genes of hearing loss by phenotype similarity analysis.
3. 学会等名 Human Genetics Asia 2023 (The 68th Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics). (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Matsunaga T
2. 発表標題 Clinical approach to genetic hearing loss in the era of information explosion
3. 学会等名 Keynote Lecture, The 75th Korean Audiological Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Matsunaga T
2. 発表標題 Genetic spectrum of deaf-blindness and its clinical implications in cochlear implantation
3. 学会等名 Symposium: Genetic Information for CI, 14th Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences (APSCI) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	奈良 清光 (Nara Kiyomitsu) (40260327)	独立行政法人国立病院機構(東京医療センター臨床研究センター)・聴覚・平衡覚研究部・研究員 (82643)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	務台 英樹 (Mutai Hideki) (60415891)	独立行政法人国立病院機構（東京医療センター臨床研究センター）・その他部局等・研究員 (82643)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関